

Среда ССФР обеспечивает высокое накопление лептоспир и в течение 3 пересевов гарантирует их высокую иммуногенность и поэтому ее целесообразно использовать для выращивания матровой и производственной культур (таблица 6).

Таблица 6 – Сравнительная оценка антигенной активности лептоспир, выращенных на среде ССФР

Количество пересевов в среде ССФР	Титр антител в сыворотке крови кроликов к лептоспирам разных серологических групп					
	Pomona	Tarassovi	Grippothyphosa	Icterohaemorrhagia	Canicola	Sejroe
1	1:1600	1:400	1:1600	1:800	1:800	1:1600
2	1:1600	1:400	1:1600	1:800	1:800	1:1600
3	1:1600	1:400	1:1600	1:800	1:800	1:1600
6	1:800	1:400	1:400	1:400	1:400	1:800

Среда ССФБ даже после 6 пересевов лептоспир гарантирует сохранение их антигенной активности и высокую иммуногенность (таблица 7).

Таблица 7 – Сравнительная оценка антигенной активности лептоспир, выращенных на среде ССФБ

Количество пересевов в среде ССФБ	Титр антител в сыворотке крови кроликов к лептоспирам разных серологических групп					
	Pomona	Tarassovi	Grippothyphosa	Icterohaemorrhagia	Canicola	Sejroe
1	1:1600	1:800	1:1600	1:800	1:800	1:1600
2	1:1600	1:800	1:1600	1:800	1:800	1:1600
3	1:1600	1:800	1:1600	1:800	1:800	1:1600
6	1:1600	1:800	1:1600	1:800	1:800	1:1600

Заключение. По результатам проведенной работы установлена гемолитическая активность лептоспирозных бактерий, выращенных на средах разного состава. Результаты исследований свидетельствуют о наличии различий антигенной активности лептоспир, выращенных как на общепринятых, так и экспериментальных средах на основе сывороток крови барана. Полученные результаты позволяют оптимизировать способ культивирования лептоспирозных бактерий с целью изготовления соответствующих вакцин и диагностикумов.

Литература: 1. Алимова, Е.К. Липиды в организме животных и человека / Е.К. Алимова, А.Т. Аствацатурьян, Л.В. Жаров. – 1974. – С. 10-20. 2. Ананьина, Ю.В. К характеристике патогенных свойств лептоспир: Автореф. дис. ... канд. мед. наук / Ю.В. Ананьина. – М., 1974. – 22 с. 3. Лептоспироз / Под ред. В.С. Киктенко. – М.: Изд. УДН, 1985. – 150 с. 4. Практикум по микробиологии / Под ред. Н.С. Егорова. – М.: Изд. Моск. ун-та, 1976. – 305 с. 5. Ситков, В.И. Научные и практические основы промышленного производства и применения вакцин: Дисс. (в форме научного доклада) ... докт. вет. наук. / В.И. Ситков. – М., 1997. – С. 29-37. 6. Сусский, Е.В. Вакцина против лептоспироза животных концентрированная: автореф. дисс. ... канд. вет. наук / Е.В. Сусский. – М., 1997. – 20 с. 7. Bazovska, S. // Cs. Epidem. – 1978. – V. 27, № 3. – P. 137-143. 8. Bazovska, S. / S. Bazovska, E. Kmety, J. Rak // Zbl. Bakt. Hyg. A. – 1984. – V. 257, № 4. – P. 517-520. 9. Gul, S. / S. Gul, A.D. Smith // Biochim. Biophys. Acta. – 1974 – V. 367, № 3. – P. 271-281. 10. Kasarov, L.B. // J. Med. Microbiol. – 1970. - №3. – P. 23-27.

Статья поступила 20.09.2010г.

УДК 619 : 615.371 / 372 : 616.986.7

ОЦЕНКА ЭСТЕРАЗНОЙ И ФОСФОЛИПАЗНОЙ АКТИВНОСТИ ЛЕПТОСПИР, ВЫРАЩЕННЫХ НА РАЗНЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ

Зайцев В.В.*, Дремач Г.Э.**, Зайцева А.В.**

*УП «Витебская биофабрика», г. Витебск, Республика Беларусь

**УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины» г. Витебск, Республика Беларусь

В статье представлены результаты исследований по влиянию состава питательных сред, используемых для культивирования лептоспир, на их эстеразную и фосфолипазную активность.

The article feature the data on the influence of the medium content for growth of leptospirae and their estherase and phospholipase activity.

Введение. В течение долгого времени методы изучения возбудителя лептоспироза значительно отставали от общего уровня микробиологических исследований возбудителей других бактериальных и вирусных болезней [2, 8].

В настоящее время в связи с усовершенствованием лабораторной техники и применением химически чистых реактивов появилась возможность для более углубленного изучения метаболизма лептоспир, их биологической активности, серологических свойств и др. [3].

Способность микроорганизмов продуцировать определенные ферменты используется в целях их таксономии и идентификации [4].

Учитывая эти обстоятельства, важным в теоретическом и практическом отношении, в первую очередь, является решение проблемы энзимологии лептоспир, в частности, выяснение особенностей их ферментного

спектра, поскольку как об интенсивности обмена веществ, так и о его регуляции можно прямо или косвенно судить, исходя из ферментного оснащения любого живого организма [1, 6].

Работами многих исследователей установлено, что лептоспиры образуют ряд ферментов, среди которых наиболее изученными являются фосфолипазы и эстеразы. Интерес к этим ферментам объясняется особенностью метаболизма лептоспир, использующих в качестве основного источника углерода липиды и свободные жирные кислоты [7].

Под действием липаз и фосфолипаз происходит гидролиз сложно-эфирных связей в молекулах нейтральных липидов и фосфолипидов соответственно, и при этом высвобождаются жирные кислоты – основной источник углерода и энергии для лептоспир [5]. Липазы и фосфолипазы микроорганизмов являются, как правило, внеклеточными ферментами.

Некоторые микроорганизмы способны образовывать внутриклеточные эстеразы.

Вероятно, основная функция этих ферментов состоит в мобилизации собственных липидов клетки, а также в обновлении клеточных структур.

Липазной активностью обладают все сапрофитные и многие патогенные штаммы лептоспир. Липазная активность является стабильной характеристикой лептоспир, но не является серогрупповым признаком и зависит от физиологических особенностей штамма, условий культивирования и возраста культуры.

Фосфолипазы отличаются большей специфичностью к положению эфирной связи в молекуле фосфолипида. Активация фосфолипаз ионами Ca^{+2} вызвана связыванием жирных кислот, освобождающихся при расщеплении фосфолипидов, и удалением их с поверхности фермента.

Индивидуальные ферменты группы микробных фосфолипаз строго специфичны к структуре субстрата. Причем у одних микроорганизмов это свойство проявляется как исключительная специфичность одной из нескольких однотипных фосфолипаз, синтезируемых клеткой, к определенному фосфолипиду.

Внеклеточные фосфолипазы являются, как правило, активными компонентами бактериальных токсинов или, не действуя токсически, служат факторами вспомогательного характера, т.е. могут ускорять или усиливать токсический эффект. При этом особое значение для бактериальных клеток приобретают ингибиторы фосфолипаз. Расположенные в периплазматическом пространстве или связанные с цитоплазматической мембраной, эти вещества белковой природы предохраняют липиды мембран от гидролиза внеклеточной фосфолипазой в процессе ее секреции, причем степень их влияния возрастает по мере увеличения фосфолипазной активности.

Выявление четких различий в эстеразной и фосфолипазной активности лептоспир, полученных на средах разного состава, на сегодняшний день является актуальной задачей.

Без этих исследований трудно рассчитывать на разработку методов идентификации лептоспир, диагностики и профилактики лептоспироза.

Основной целью настоящего исследования является расширение и углубление знаний о питательных потребностях и метаболизме лептоспир. Для выполнения поставленной цели следует решить задачу по изучению эстеразной и фосфолипазной активности лептоспир на питательных средах разного состава.

Материалы и методы. Эстеразную активность лептоспир определяли по способности вызывать гидролиз твина-80.

В работе использовали 6 патогенных штаммов: *Leptospira pomona* ВГНКИ-6; *Leptospira tarassovi* ВГНКИ-4; *Leptospira grippothyphosa* ВГНКИ-1; *Leptospira icterohaemorrhagia* ВГНКИ-2; *Leptospira canicola* ВГНКИ-3; *Leptospira hardjo* ВГНКИ-5.

Исследования проводили на плотной питательной среде следующего состава: натрия хлорида – 0,5 г, кальция хлорида – 0,02 г, агар Дифко – 1 г, твин-80 – 1,0 см³ и дистиллированная вода до 100,0 см³.

Среду готовили поэтапно, стерилизуя по 1,0 см³ твин-80 в 5,0 см³ дистиллированной воды отдельно от основной среды при температуре 116-120⁰С в течение 20 минут. Затем простерилизованный твин-80 вносили в основную среду. После тщательного перемешивания среды ее расфасовывали по 15-20 см³ в чашки Петри. В застывшем агаре специальным пробойником делали лунки диаметром 8 мм и заполняли их культурой лептоспир, выращенных в питательных средах разного состава с содержанием не менее 90 клеток в поле зрения микроскопа (при увеличении x400). В качестве контроля в одну из лунок добавляли стерильную питательную среду без лептоспир.

Чашки Петри инкубировали в термостате при температуре 28⁰С и ежедневно просматривали. Наличие эстеразной активности и ее степень определяли по появлению зон изменения среды и их ширины вокруг лунок с испытуемыми культурами, образованных преципитатом олеата кальция.

Окончательный учет результатов проводили на 6-7 сутки инкубации в термостате, т.к. к этому времени ширина зон изменения сред достигала наибольшей величины.

Все опыты по определению эстеразной активности лептоспир проводили в трехкратной последовательности. Всего проведено 312 исследований по выявлению эстеразной активности у 6 штаммов лептоспир.

Фосфолипазную активность изучали у штаммов лептоспир, которые регулярно пассировали на чувствительных лабораторных животных.

Вирулентность штаммов определяли в опытах на животных по величине 50%-ной летальной дозы (LD₅₀) для золотистых хомячков 4-недельного возраста с массой 45-50 г и выражали соответствующим количеством микробных клеток.

Концентрацию лептоспир (в см³) культуры, выращенной на средах разного состава, оценивали в счетной камере Петрова-Хауссера.

Фосфолипазную активность определяли на плотной питательной среде методом агаровых слоев.

Для этого готовили и разливали в чашки Петри плотные среды разного состава. На поверхность среды делали по методу Дригальского посев 3-7-дневных культур лептоспир, выращенных на средах разного состава.

Чашки Петри с посевами инкубировали в термостате при температуре 28⁰С.

На 5-7 сутки после появления колоний лептоспир в чашки Петри вносили второй слой среды, содержащий 1% L-лецитина, 1% агара Дифко и 98% забуференной дистиллированной воды, предварительно расплавленной и охлажденной до 45⁰С. После того, как она застывала, посевы вновь помещали в термостат при температуре 28⁰С и наблюдали в течение 20-30 суток. Опыты ставили не менее, чем в 3 повторностях.

Фосфолипазную активность оценивали по ширине зон просветления среды с лецитином над колониями лептоспир и вокруг них.

Для выращивания лептоспир в опытах по определению их эстеразной и фосфолипазной активности использовали питательные среды: среда на основе сыворотки крови кролика (ССК); среда на основе сыворотки крови барана (ССБ); среда на основе сыворотки крови оленя (ССО); среда на основе гемолизированной крови кролика (СГК); среда на основе гемолизированной крови овец (СГО); витаминизированная среда на основе сыворотки крови кролика (СВСК); витаминизированная среда на основе сыворотки крови барана (СВСБ); среда с фактором роста на основе сыворотки крови барана (ССФР); среда с экстрактом дрожжей на основе сыворотки крови барана (ССД); среда витаминизированная с фактором биосинтеза специфических антигенов на основе сыворотки крови барана (ССФБ); полусинтетическая среда Рассела (ПСР).

Результаты исследований. Результаты исследований по изучению эстеразной активности лептоспир показали, что все изученные штаммы были активны в отношении твин-80. Это проявлялось в выявлении мутных зон вокруг лунок с культурами штаммов на средах с твин-80. Образование этих зон связано с тем, что при гидролизе твина остатки жирных кислот взаимодействуют с солями кальция и образуют нерастворимые комплексы омата.

Ширина зон на контрольной среде с твином-80 у *L. romona*, выращенной на средах ССК, ССБ, ССО, СГК и СГО, составила 2,6±0,2 - 2,92±0,3 мм, *L. tarassovi* - 2,6±0,22 - 2,94±0,22 мм, *L. grippothyphosa* - 3,1±0,2 - 3,3±0,21 мм, *L. icterohaemorrhagiae* - 2,75±0,18 - 2,92±0,23 мм, *L. canicola* - 2,92±0,24 - 3,26±0,24 мм, *L. hardjo* - 2,98±0,21 - 3,24±0,28 мм.

Ширина зон у штаммов лептоспир, выращенных на средах СВСК и СВСБ была достоверно больше и составила, соответственно, у *L. romona* 4,14±0,3-4,22±0,28 мм, *L. tarassovi* - 4,28±0,4 - 4,32±0,36 мм, *L. grippothyphosa* - 4,52±0,2 - 4,6±0,34 мм, *L. icterohaemorrhagiae* - 4,36±0,35 - 4,42±0,48 мм, *L. canicola* - 4,55±0,45 - 4,67±0,51 мм, *L. hardjo* - 4,52±0,37 - 4,56±0,58 мм.

Культуры всех штаммов лептоспир, выращенные на среде ССД, проявляли существенно более выраженную эстеразную активность, чем на средах ССК, ССБ, ССО, СГК и СГО. По данным В.С. Киктенко и др. (1987) отмечено, что патогенным штаммам лептоспир присуща более разнообразная эстеразная активность.

Известно, что нуклеинаты натрия существенно повышают патогенность некоторых бактерий.

Очевидно, что включение в ССБ среду экстракта дрожжей, содержащего соли нуклеиновых кислот, стимулирует эстеразную активность свойственную для патогенных культур.

Культуры лептоспир после однократного 7-суточного культивирования на среде ПСР проявляли выраженную эстеразную активность (ширина зон изменения среды 4,16±0,47 - 4,35±0,36 мм).

Весьма высокой эстеразной активностью обладали все без исключения штаммы лептоспир, выращенные на сложной среде ССФР. Так, ширина зон изменения контрольной среды составила соответственно у *L. romona* 7,12±0,4 мм, *L. tarassovi* - 6,95±0,55 мм, *L. grippothyphosa* - 7,28±0,38 мм, *L. icterohaemorrhagiae* - 7,30±0,42 мм, *L. conicola* - 7,41±0,48 мм, *L. hardjo* - 7,45±0,51 мм.

Лептоспир, выращенные на среде ССФБ, по эстеразной активности уступала только бактериям, полученным на среде ССФР. При этом ширина зон изменения составила 4,92±0,46 - 5,35±0,58 мм.

В дальнейшем с целью выдачи рекомендаций по созданию рецептур питательных сред для хранения и поддержания штаммов и производственного культивирования изучили влияние пассирования лептоспир на средах разного состава на их эстеразную активность.

Пересев культур лептоспир на средах ССГ, СВСБ, ССД и ПСР производили через 15 суток, средах ССФР и ССФБ – через 30 суток.

Наиболее высокая эстеразная активность отмечена как через 3, так и через 6 пассажей у лептоспир, выращенных на среде ССФБ, которая составляла соответственно 4,81±0,35 - 5,12±0,41 мм и 4,65±0,25 - 4,88±0,38 мм.

Через 3 пассажа культур лептоспир на среде ССФР сохранялась высокая эстеразная активность и составляла 4,88±0,35 - 5,18±0,3 мм, которая вместе с тем через 6 пересевов снижалась до значения 2,52±0,18 - 2,85±0,21 мм.

Существенное снижение эстеразной активности у лептоспир установлено после трех пересевов на средах ПСР, ССБ, СВСБ и ССД.

Вместе с тем, нами установлено, что витамины группы В и экстракт дрожжевой ингибируют снижение эстеразной активности у лептоспир при многократных пересевах.

При изучении фосфолипазной активности нами установлено, что ширина зон разложения лецитина была больше у штаммов лептоспир, выращенных на средах ССФР и ССФБ и равнялась 10,0±0,8 - 12,4±0,8 мм.

Значительно ниже значение этой величины было у лептоспир, полученных на средах ССК, ССБ, ССО, СГК и СГО (4,4±0,6 - 5,4±0,6 мм).

Несколько выше этот показатель зарегистрирован у лептоспир, выращенных на витаминизированных средах, и составил 5,9±0,7 - 6,5±0,8 мм.

Лептоспир, полученные на полусинтетической среде, обеспечивали ширину зоны разложения лецитина 9,0±0,7 - 9,2±1,1 мм.

Нами были взяты клоны штаммов лептоспир с разной вирулентностью и проведено сравнение их фосфолипазной активности и вирулентности. Установлено, что культуры с более высокой вирулентностью обладают и более высокой фосфолипазной активностью. Также выявлено, что по мере увеличения вирулентности возрастает и фосфолипазная активность лептоспир.

Таким образом, исследование фосфолипазной активности лептоспир на плотных питательных средах разного состава методом агаровых слоев с лецитином выявило способность изученных штаммов лептоспир

продуцировать фермент фосфолипазу А. Это проявляется образованием над колониями и вокруг них зон просветления среды. Вирулентные штаммы лептоспир обладают более высокой фосфолипазной активностью, чем авирулентные.

Это наиболее наглядно прослеживается при изучении клонов одних и тех же штаммов лептоспир с разной вирулентностью.

Далее нами было изучено влияние пассирования спирохет на их фосфолипазную активность.

Сравнение проводили на средах ПСР, ССФР и ССФБ как объектах, обеспечивающих высокую фосфолипазную активность спирохет.

На среде ПСР даже через 2 пассажа лептоспир фосфолипазная активность существенно падала и составляла всего $4,91 \pm 0,3$ мм, в то время как на средах ССФБ и ССФР сохранялась на уровне 10,2-11,6 мм.

Среды ССФБ и ССФР обеспечивали накопление жизнеспособных клеток лептоспир $704,1-922,5$ млн/см³, тогда как производственная среда – 80-90 млн/см³.

Заключение. По результатам проведенной работы определены эстеразная и фосфолипазная активность лептоспирозных бактерий, выращенных на питательных средах разного состава.

Для пересева лептоспир в процессе хранения целесообразно использовать среды ССФБ и ССФР, питательные компоненты которых обеспечивают как высокую эстеразную, так и фосфолипазную активность.

Среды ССФБ и ССФР обеспечивают высокое накопление лептоспир с сохранением их высокой вирулентности, что весьма важно при изготовлении биологических препаратов.

Литература. 1. Ананьина, Ю.В. К характеристике патогенных свойств лептоспир: Автореф. дис. ... канд. мед. наук / Ю.В. Ананьина. – М., 1974. – 22 с. 2. Вакцина против лептоспироза животных лиофилизированная / А.Н. Панин [и др.] // Ветеринария. – 2002. - № 1. – С. 21-24. 3. Волина, Е.Г. Культивирование лептоспир в жидкой питательной среде с лизированной кроличьей кровью / Е.Г. Волина, Л.Е. Саруханова // ЖМЭИ. – 2001. – № 1. – С. 3-5. 4. Ситьков, В.И. Изготовление и испытание малобелковой питательной среды для культивирования лептоспир / В.И. Ситьков, В.И. Бобрышев, И.К. Тутов // Сборник науч. трудов Ставропольской ГСХА. – Ставрополь, 1994. – С. 42-45. 5. Ситьков, В.И. Новая питательная среда для культивирования лептоспир / В.И. Ситьков, В.И. Бобрышев, И.К. Тутов // Материалы Междунар. конф. – Барнаул, 1995. – С. 98-99. 6. Ситьков, В.И. Опыт получения сухой вакцины против лептоспироза животных / В.И. Ситьков, В.Н. Лемешко // Тезисы докл. 5-й Всерос. конф. Щелково, 1996. – С. 99. 7. Соболева, Г.Л. Рост лептоспир в альбуминовой питательной среде / Г.Л. Соболева // Биологические препараты против инфекционных болезней животных. – М., 1981. – С. 51-54. 8. Справочник ветеринарного лаборанта / Ф.З. Андросов [и др.]; под ред. В.Я. Антонова. – М.: Колос, 1981. – С. 37.

Статья поступила 20.09.2010г.

УДК 619: 579. 842. 14: 615. 37: 636.4

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ СХЕМ ВВЕДЕНИЯ ПРЕПАРАТА ПУЛСАЛ НА РЕЗИСТЕНТНОСТЬ ЖИВОТНЫХ

Зайцева А.В., Корочкин Р.Б.

УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины»
г. Витебск, Республика Беларусь

Авторами проведены исследования по оценке влияния схем введения препарата ПулСал на резистентность лабораторных животных и поросят разных возрастных периодов.

The authors have received the data on the affect of the PulSal substance on the resistance of laboratory animals of different ages.

Введение. Иммунодефициты крайне отрицательно влияют на организм животного. Здоровье животных зависит от ряда факторов. К их числу относятся: содержание, кормление, программа прививок и, что наиболее важно, состояние иммунной системы. При иммунодефицитах чаще всего наблюдается: осложнения за счет инфекций; увеличение конверсии корма; снижение продуктивности; высокая выбраковка; слабая (низкая) реакция на вакцинацию; гибель животных [2; 7].

В связи с этим поиск новых средств, для профилактики и лечения как зараженных, так и незаразных болезней у животных является актуальным и обоснованным. Наилучшим решением проблемы иммунодефицита у животных является применением иммунокорректирующей терапии [5].

Коррекция иммунологических и других физиологических показателей организма до состояния нормы приводит к значительному (до 10 – 30 %) повышению продуктивности у сельскохозяйственных животных. Устойчивость организма животных к заболеваниям зависит от состояния естественной резистентности и иммунной реактивности. Разнообразные механизмы защиты, которыми располагает организм животных, в большинстве своем неспецифические. Они одинаково действуют на любой биологический объект [10].

У молодняка выделяют 3 возрастных иммунных дефицитов. На фоне возрастных иммунных дефицитов возникают различные заболевания, чаще всего обусловленные токсикозами, условно-патогенными и патогенными микроорганизмами и паразитами. Они и приводят к развитию приобретенных (вторичных) иммунных дефицитов [4; 8].

Следует отметить, что антибиотики, противовирусные и противогрибковые средства будут мало- или неэффективными при пониженном антиинфекционном иммунитете [1]. Отсюда логически вытекает вывод, что применение иммуностропных препаратов является целесообразным в комплексном лечении инфекционных заболеваний.

Имунокоррекция (иммуномодуляция) предполагает использование фармакологических средств, для изменения функциональной активности иммунной системы. Они могут увеличивать (иммуностимуляция) и снижать (иммунодепрессия) уровень иммунного ответа [2].